

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:

2004年7月22日(22.07.2004)

PCT

(10) 国际公布号:

WO 2004/060914 A1

(51) 国际分类号⁷: C07K 14/47, 16/18, C07H 21/00, A61K 38/17, 31/7088, A61P 1/16, 35/00

(21) 国际申请号: PCT/CN2003/001154

(22) 国际申请日: 2003年12月31日(31.12.2003)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权: 03114718.6 2003年1月3日(03.01.2003) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 中国科学院上海生命科学研究院(SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国上海市岳阳路320号, Shanghai 200031 (CN)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 赵磊钧(ZHAO, Mujun) [CN/CN]; 刘占武(LIU, Zhanwu) [CN/CN]; 裘捷(QIU, Jie) [CN/CN]; 李载平(LI, Zaiping) [CN/CN]; 中国上海市岳阳路320号, Shanghai 200031 (CN)。

(74) 代理人: 上海专利商标事务所(SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE); 中国上海市桂平路435号徐迅, Shanghai 200233 (CN)。

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NL, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:

— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参看刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: A HUMAN LIVER REGENERATION ASSOCIATED PROTEIN AND THE USE OF IT

(54) 发明名称: 人肝再生相关蛋白及其应用

(57) Abstract: The invention discloses a new human liver regeneration associated hLRTM4 protein, and the polynucleotide encoding it. This invention also discloses the preparation method and application of hLRTM4 protein and its polynucleotide. This invention also discloses the method for curing liver injury by using the said hLRTM4 protein and the method for curing liver cancer by using its antagonist (e.g. reverse nucleic acid and antibody). This invention also provides a corresponding medicine composition.

(57) 摘要

本发明提供了一种新的人肝再生相关蛋白-hLRTM4 蛋白以及编码 hLRTM4 蛋白的多核苷酸。本发明还公开了 hLRTM4 蛋白及其多核苷酸的制法和用途。hLRTM4 蛋白可用于治疗肝脏损伤, 而其拮抗剂(如反义核酸和抗体)可治疗肝癌。本发明还提供了相应的药物组合物。

Best Available Copy

WO 2004/060914 A1

人肝再生相关蛋白及其应用

技术领域

本发明属于分子生物学和医学领域，具体地说，本发明涉及新的人肝再生相关蛋白 hLRTM4 及其编码序列。本发明还涉及此多核苷酸和多肽的用途和制备。

背景技术

肝脏具有明显的再生现象，肝脏部分切除后，或受到物理及化学损伤时，肝脏就开始再生，并且再生持续到肝脏与身体的比例到达一定值时终止。肝再生现象与多种肝脏疾病相伴随，如肝硬化、急慢性肝炎等。肝癌的发生过程也往往伴随有肝再生现象；同时，临床上肝再生现象被应用于部分肝脏移植以及肝细胞移植。

肝癌是一种世界范围内的恶性肿瘤，死亡率极高，尤其中国是肝癌的高发地区。每年世界范围内有 25 万人死于肝癌，我国占了其中的 40%(李绍白，《肝脏病学》，人民卫生出版社，1995)。肝癌的发生与病毒感染如乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染有关，食用含有黄曲霉毒素等致癌物质的水和食物等都是肝癌发病的主要因素。目前还发现肝癌发生与肝脏再生有密切的关系：肝癌发生的过程往往伴有肝再生现象。现已知道，肝再生是受到紧密调控的肝细胞增殖，而肝细胞癌是肝细胞不受控制的增殖。现在有的学说认为，肝癌发生的过程包括肝脏被病毒或化学物质损伤，持续的损伤导致持续的再生，再生失去控制后便成为肝癌。所以了解肝癌与肝再生的关系，无疑有助于人们更好地对早期肝癌进行预测与治疗。

目前，对于一些肝脏疾病的治疗最有效的方案是肝脏移植，而且肝脏移植手术的技术已经比较成熟，但是每年能够受益于这一技术的人数非常有限，这是因为目前的肝脏移植有两个方面受到限制：供体来源和免疫排斥。要想使更多的人受益于肝脏移植，就必须突破这两个限制。现在突破这个限制的主要策略是部分肝移植。部分肝移植可以使一个供体肝脏移植到两个人或者更多，同时也使亲属间肝脏移植成为可能，从而减少了免疫排斥。另外一个更理想的方案是肝细胞移植，即将肝细胞直接移植进病人肝脏或者脾脏部位，肝细胞逐渐再生，承担起肝脏的功能。肝细胞移植可以利用病人自己的肝细胞，从而不会发生免疫排斥现象；肝脏移植或肝细胞移植都是利用了肝脏具有再生的功能，但是对肝脏再生必需的

的蛋白质因子和肝脏再生的机理目前还不清楚。

为了满足肝移植以及肝癌治疗的需求，本领域迫切需要了解与人的肝组织再生有关的因素，尤其是与肝再生有关的基因和蛋白。

发明内容

本发明的目的是提供一种新的肝再生相关蛋白-hLRTM4 蛋白以及其片段、类似物和衍生物。

本发明的另一目的是提供编码这些多肽的多核苷酸。

本发明的另一目的是提供生产这些多肽的方法以及该多肽和编码序列的用途。本发明涉及的 hLRTM4 基因与肝脏再生和癌变有关，这一重要发现在国内外还未见报道。对 hLRTM4 的分子机制的研究有利于阐明肝脏再生的分子生物学机制，同时也可用于肝脏疾病的治疗。

在本发明的第一方面，提供了一种药物组合物，它含有安全有效量人肝再生相关蛋白，以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

较佳地，所述的人肝再生相关蛋白具有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述的安全有效量的人肝再生相关蛋白为 1 微克/千克体重/每天-约 5 毫克/千克体重/每天。

在本发明的第二方面，提供了一种人肝再生相关蛋白的用途，它被用于制备治疗肝脏损伤的药物。

较佳地，所述的药物用于治疗急慢性肝炎、肝硬化或肝癌引起的肝脏病变。

在本发明的第三方面，提供了一种药物组合物，它含有安全有效量人肝再生相关蛋白的拮抗剂，所述的拮抗剂选自(i)hLRTM4 的反义核酸分子，所述的核酸分子具有 SEQ ID NO:1 中所示的长度为 15-625bp 的核酸序列，和/或(ii) hLRTM4 的特异性抗体，

以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

较佳地，所述的核酸分子具有全长的 SEQ ID NO:1 反义序列。

在另一优选例中，所述的安全有效量的人肝再生相关蛋白的拮抗剂为 1 微克/千克体重/每天-约 5 毫克/千克体重/每天。

在本发明的第四方面，提供了一种人肝再生相关蛋白拮抗剂的用途，所述的拮抗剂选自(i)hLRTM4的反义核酸分子，所述的核酸分子具有SEQ ID NO:1中所示

的长度为15-625bp的核酸序列, (ii) hLRTM4的干扰性小分子双链RNA, 所述的RNA具有SEQ ID NO:1中所示的长度为17-23bp的核酸序列并且在3'端具有dtdt; 和/或(iii) hLRTM4的特异性抗体, 所述的拮抗剂用于制备抑制肝癌的药物。

较佳地, 所述的拮抗剂是hLRTM4的反义核酸分子, 所述的核酸分子具有SEQ ID NO:1中所示的长度为15-625bp的核酸序列。在另一优选例中, 所述的干扰性小分子双链RNA含有SEQ ID NO:9-13之一所示的序列。

本发明的其它方面由于本文的技术的公开, 对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

图1显示了RT-PCR检测hLRTM4基因在各种不同细胞系中的表达状况。图中SK为神经母细胞瘤细胞, L-02为正常肝细胞, 7404为肝癌细胞, 7721为肝癌细胞, HepG2为肝细胞瘤细胞, BGC为低分化胃癌细胞, SGC为胃腺癌细胞, N45为低分化胃癌细胞, A431为表皮癌细胞, A375为恶性黑色素瘤细胞, A549为肺癌细胞, Tca为舌鳞癌细胞-, Hela为宫颈癌, 同时扩增GAPDH基因作为内参。

图2显示了RT-PCR检测hLRTM4基因在肝癌和癌旁组织中的表达状。图中135K, 1055C, 183K, 58C, 152K, 158K, 1049C为肝癌组织样品, 135L, 1055P, 183L, 58N, 152L, 158L, 1049P为对应的癌旁组织样品。同时扩增GAPDH基因作为内参。

图3显示了hLRTM4基因反义核酸抑制肝癌细胞的增殖。

7404为肝癌细胞, 7404/pCDNA3为转染pCDNA3载体的7404细胞, 7404/LR+为转染正义hLRTM4基因的7404细胞, 7404/LR-为转染反义hLRTM4基因的7404细胞, 将上述细胞无血清DMEM培养24h同步化后按 5×10^3 /孔的细胞密度接种于24孔板。以噻唑蓝法(MTT法)于570nm处测定8天内各组细胞的吸光值变化(6孔复测), 绘制细胞生长曲线。

图4显示了hLRTM4基因反义序列在裸鼠致瘤模型中的作用。

取5周龄的裸鼠, 皮下注射7404细胞致瘤, 尾静脉注射各种质粒。图中所示的3个裸鼠分别是: 1为对照组, 即致瘤后不做任何处理(7404对照); 2为致瘤后尾静脉注射pCDNA3LR+质粒(7404+LR+), 3为致瘤后尾静脉注射pCDNA3LR-质粒(7404+LR-)。

图5显示了hLRTM4在小鼠模型中对肝再生的促进作用。

采用 CC14 肝损伤动物模型，如图所示，1 为正常大鼠，2 为灌喂 0.5 毫升四氯化碳/千克体重，3 为灌喂 1 毫升四氯化碳/千克体重，其中 2、3 组的黑色柱型表示导入 hLRTM4 基因。结果表明，正常肝组织中 GPT 水平较低；摄入四氯化碳后，GPT 水平升高，并且摄入量越大，GPT 水平越高；导入 hLRTM4 基因后，伴随 GPT 水平下降。这表明 hLRTM4 基因对肝组织损伤有修复作用。

具体实施方式

本发明人从人的肝库中克隆到的人的 hLRTM4 基因，与本发明人已报道并申请了专利的大鼠 LRTM4 基因有 87% 的同源性。同源性搜索比较发现人的 LRTM4 序列与 1995 年在人的小肠上皮细胞中发现和克隆的 il-tmp 基因相似。基因的 cDNA 全长为 1362bp，有一个 606 核苷酸的编码区，编码长度为 202 氨基酸残基的蛋白质。hLRTM4 蛋白是一个四跨膜蛋白，与肝再生密切相关。动物实验已证实可应用于促进肝脏再生和肝脏损伤修复。

本发明的研究还证实了人的 hLRTM4 基因的在肝癌细胞中高表达，并可作为肝癌诊断的分子标志物。此外，hLRTM4 反义核酸抑制肝癌细胞的生长和裸鼠肝癌致癌模型中肝癌实体瘤的生长，因此，hLRTM4 的拮抗剂（如反义核酸和抗体）可用于治疗肿瘤，尤其是肝癌。

在本发明中，术语“hLRTM4 蛋白”、“hLRTM4 多肽”或“肝再生相关蛋白 hLRTM4”可互换使用，都指具有肝再生相关蛋白 hLRTM4 氨基酸序列 (SEQ ID NO:2) 的蛋白或多肽。它们包括含有或不含起始甲硫氨酸的肝再生相关蛋白 hLRTM4。

如本文所用，“分离的”是指物质从其原始环境中分离出来（如果是天然物质，原始环境即是天然环境）。如活体细胞内的天然状态下的多聚核苷酸和多肽是没有分离纯化的，但同样的多聚核苷酸或多肽如从天然状态中同存在的其他物质中分开，则为分离纯化的。

如本文所用，“分离的 hLRTM4 蛋白或多肽”是指 hLRTM4 多肽基本上不含天然与其相关的其它蛋白、脂类、糖类或其它物质。本领域的技术人员能用标准的蛋白质纯化技术纯化 hLRTM4 蛋白。

本发明的多肽可以是重组多肽、天然多肽、合成多肽，优选重组多肽。本发明的多肽可以是天然纯化的产物，或是化学合成的产物，或使用重组技术从原核或真核宿主（例如，细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞）中产生。根据

重组生产方案所用的宿主，本发明的多肽可以是糖基化的，或可以是非糖基化的。

本发明还包括 hLRTM4 蛋白的片段、衍生物和类似物。

本发明的多核苷酸可以是 DNA 形式或 RNA 形式。DNA 形式包括 cDNA、基因组 DNA 或人工合成的 DNA。DNA 可以是单链的或是双链的。DNA 可以是编码链或非编码链。编码成熟多肽的编码区序列可以与 SEQ ID NO:1 所示的编码区序列相同或者是简并的变异体。如本文所用，“简并的变异体”在本发明中是指编码具有 SEQ ID NO:2 的蛋白质，但与 SEQ ID NO:1 所示的编码区序列有差别的核酸序列。

本发明还涉及与上述的序列杂交的核酸片段。本发明的实验已证实，反义的 hLRTM4 可用于抑制肿瘤的生长。如本文所用，“核酸片段”的长度至少含 15 个核苷酸，较好是至少 30 个核苷酸，更好是至少 50 个核苷酸，最好是至少 100 个核苷酸以上。核酸片段可用于核酸的扩增技术（如 PCR）以确定和/或分离编码 hLRTM4 蛋白的多聚核苷酸。

本发明的 hLRTM4 核苷酸全长序列或其片段通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于 PCR 扩增法，可根据本发明所公开的有关核苷酸序列，尤其是开放阅读框序列来设计引物，并用市售的 cDNA 库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的 cDNA 库作为模板，扩增而得有关序列。当序列较长时，常常需要进行两次或多次 PCR 扩增，然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

此外，还可用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。

本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体，以及用本发明的载体或 hLRTM4 蛋白编码序列经基因工程产生的宿主细胞，以及经重组技术产生本发明所述多肽的方法。

用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。获得的转化子可以用常规方法培养，表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞，培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法（如温度转换或化学诱导）诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。

在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞

外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理（盐析方法）、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析（凝胶过滤）、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析（HPLC）和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

重组的 hLRTM4 蛋白或多肽有多方面的用途。这些用途包括（但不限于）：直接做为药物治疗 hLRTM4 蛋白功能低下或丧失所致的疾病（尤其是促进肝脏损伤的修复），和用于筛选促进或对抗 hLRTM4 蛋白功能的抗体、多肽或其它配体。用表达的重组 hLRTM4 蛋白筛选多肽库可用于寻找有治疗价值的能抑制或刺激 hLRTM4 蛋白功能的多肽分子。

另一方面，本发明还包括对 hLRTM4 DNA 或是其片段编码的多肽具有特异性的多克隆抗体和单克隆抗体，尤其是单克隆抗体。这里，“特异性”是指抗体能结合于 hLRTM4 基因产物或片段。

本发明不仅包括完整的单克隆或多克隆抗体，而且还包括具有免疫活性的抗体片段，如 Fab' 或 (Fab)₂ 片段；抗体重链；抗体轻链；或嵌合抗体。

本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。例如，纯化的 hLRTM4 基因产物或者其具有抗原性的片段，可被施用于动物（如家兔，小鼠等）以诱导多克隆抗体的产生。可使用多种佐剂增强免疫反应，其中包括（但不限于）弗氏佐剂等。本发明的单克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备。抗 hLRTM4 蛋白的抗体可用于免疫组织化学技术中，检测活检标本中的 hLRTM4 蛋白。本发明实验已证实了 hLRTM4 可作为肝癌诊断的分子标记物。

抑制 hLRTM4 mRNA 的寡聚核苷酸（包括反义 RNA 和 DNA）以及核酶也在本发明的范围之内。反义的 RNA 和 DNA 及核酶可用已有的任何 RNA 或 DNA 合成技术获得，如固相磷酸酰胺化学合成法合成寡核苷酸的技术已广泛应用。反义 RNA 分子可通过编码该 RNA 的 DNA 序列在体外或体内转录获得。

特别优选的干扰性双链小分子 RNA，它们具有对应于 LRTM4 的核苷酸序列且长度通常为 17-23bp，较佳地为 19-21bp，并且在 3 端带有 dtdt。

利用本发明蛋白，通过各种常规筛选方法，可筛选出与 hLRTM4 蛋白发生相互作用的物质，如受体、抑制剂、激动剂或拮抗剂等。

在一优选例中，LRTM4 蛋白可作为靶位筛选抑制肝癌细胞生长的药物。先用 LRTM4 蛋白筛选 Optima RNA 库，获得结合于 LRTM4 蛋白的特异 Optima。分离结合

的 Optima, 并大量制备。然后, 将该 Optima 导入肝癌细胞, 进一步在细胞水平, 研究这些小分子药物对于 LRTM4 的影响。例如, 利用高表达 LRTM4 蛋白的细胞(如 7404/LR+细胞株), 在培养基中分别加入这些小分子药物, 并用例如噻唑蓝法(MTT 法)检测对细胞增殖的影响, 同时用 7404 细胞作为对照。这样, 可筛选出抑制 7404/LR+细胞株增殖的 Optima RNA 分子, 从而作为潜在的药物进行研究。

本发明蛋白及其抗体、抑制剂、激动剂、拮抗剂或受体等, 当在治疗上进行施用(给药)时, 可提供不同的效果。例如, hLRTM4 可促进肝脏再生和肝脏损伤修复, 而 hLRTM4 的反义核酸片段和抗体可用于抑制 hLRTM4 的表达和活性, 从而抑制肿瘤的生长。通常, 可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中, 其中 pH 通常约为 5-8, 较佳地 pH 约为 6-8, 尽管 pH 值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药, 其中包括(但并不限于): 肌内、腹膜内、静脉内、皮下、皮内、或局部给药。

本发明的多肽可直接用于疾病治疗, 例如, 用于肝脏损伤修复方面的治疗。在使用本发明 hLRTM4 蛋白时, 还可同时与其他治疗剂, 例如肝细胞生长因子 HGF 等, 混合使用。

本发明还提供了一种药物组合物, 它含有安全有效量的本发明 hLRTM4 多肽或其激动剂、拮抗剂(如反义核酸或抗体)以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于): 盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式, 例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。诸如片剂和胶囊之类的药物组合物, 可通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液、片剂和胶囊宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量, 例如每天约 1 微克/千克体重-约 5 毫克/千克体重。此外, 本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

使用药物组合物时, 是将安全有效量的 hLRTM4 蛋白或其拮抗剂、激动剂施用于哺乳动物, 其中该安全有效量通常至少约 10 微克/千克体重, 而且在大多数情况下不超过约 8 毫克/千克体重, 较佳地该剂量是约 10 微克/千克体重-约 1 毫克/千克体重。当然, 具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素, 这些都是熟练医师技能范围内的。

本发明还涉及定量和定位检测 hLRTM4 蛋白水平的诊断试验方法。这些试验是

本领域所熟知的，且包括 FISH 测定和放射免疫测定。试验中所检测的 hLRTM4 蛋白水平，可以用作诊断肝癌等疾病。

一种检测检测样品中是否存在 hLRTM4 蛋白的方法是利用 hLRTM4 蛋白的特异性抗体进行检测，它包括：将样品与 hLRTM4 蛋白特异性抗体接触；观察是否形成抗体复合物，形成了抗体复合物就表示样品中存在 hLRTM4 蛋白。

此外，hLRTM4 多核苷酸的一部分或全部可作为探针固定在微阵列 (microarray) 或 DNA 芯片 (又称为“基因芯片”) 上，用于分析组织中基因的差异表达分析和基因诊断。用 hLRTM4 蛋白特异的引物进行 RNA-聚合酶链反应 (RT-PCR) 体外扩增也可检测 hLRTM4 蛋白的转录产物。

在本发明的一个实例中，通过 RT-PCR 检测了人的 hLRTM4 基因在 7404, 7721, L02, HepG2 等多种肝和肝癌细胞中的表达，发现该基因在正常的肝细胞系 L02 中不表达，在肝癌细胞系 7721 中有少量表达，在肝癌细胞系 HepG2、7404 中高表达。此外，hLRTM4 基因在肝癌、肠癌、胃癌细胞中高表达，在肺癌、舌鳞癌等细胞中不表达，证明该基因在消化道肿瘤中特异性的高表达。对肝癌病人的癌组织与癌旁组织样品进行 RT-PCR 检测发现，该基因在检测的 7 对样品中，3 对样品癌组织中的表达明显高于癌旁组织。说明该基因确实在癌组织中高表达。说明人的 hLRTM4 与消化道肿瘤有密切的关系，并可进一步开发作为肿瘤的分子标志物。

在另一实例中，将 hLRTM4 基因正向或反向的转入肝癌细胞系。结果证实，hLRTM4 基因与细胞增殖是相关的，导入了反向的 hLRTM4 基因可抑制了肿瘤细胞的生长。利用裸鼠肝癌致癌模型进一步证实了，反义 hLRTM4 可以抑制肿瘤的生长。因此，hLRTM4 拮抗剂 (如反义核酸) 可以开发作为抑癌药物。

在另一实例中，证实了 hLRTM4 可促进肝脏再生和肝脏损伤修复。因此，hLRTM4 及其激动剂可以开发作为促进肝再生的药物。

本发明的主要优点在于：新发现的肝细胞再生相关蛋白 hLRTM4 可以调节肝细胞的增殖，用于修复肝脏损伤。此外，由于该蛋白在肝癌和其它肿瘤细胞中的异常高表达，可应用于肝癌和其它肿瘤的检测标记。阻断该蛋白的异常高表达的药物或制剂，可抑制肿瘤细胞的恶性增殖。本发明提供的肿瘤抑制剂 (包括 hLRTM4 的反义核酸和抗体)，特异性高，是一类新型的生物工程制剂。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如Sambrook等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

实施例 1、hLRTM4 基因克隆

合成以下一对特异性引物：

5' 引物序列为：5'-GTCGTACCACCCCAAGATGT-3' (SEQ ID NO:3)

3' 引物序列为：5'-TTTAAACGGGTCCATCTCCC-3' (SEQ ID NO:4)，

通过 PCR 扩增，从人肝 cDNA 文库 (GIBICO 公司) 中扩增出 hLRTM4 基因编码区，克隆入 pMD18-T 质粒 (TaKaRa 公司)，构建成 pThLRTM4 克隆株。测序后 (博亚公司测定)，获得的 hLRTM4 的基因序列如下所示：

```
TCGTACCACC CCAGATATGTG CACTGGAGGC TGTGCCAGAT GCCTGGGGGG GACCCTCATT 60
CCCCTTGCTT TTTTGGCTT CCTGGCTAAC ATCCTGTTAT TTTTCCTGG AGGAAAAGTG 120
ATAGATGACA ACGACCACCT TTCCCAAGAG ATCTGGTTTT TCGGAGGAAT ATTAGGAAGC 180
GGTGTCTTGA TGATCTTCCC TGGCTGGTG TTCTTGGGCC TGAAGAACAA TGAAGTCTGT 240
GGGTGCTGCG GCAACGAGGG CTGTGGGAAG CGATTTGCGA TGTTACCTC CACGATATTT 300
GCTGTGGTTG GATTCTTGGG AGCTGGATAC TCGTTTATCA TCTCAGCCAT TTCAATCAAC 360
AAGGGTCCTA AATGCCTCAT GGCCAATAGT ACATGGGGCT ACCCCTTCCA CGACGGGGAT 420
TATCTCAATG ATGAGGCCTT ATGGAACAAG TGCCGAGAGC CTCTCAATGT GGTTCCTTGG 480
AATCTGACCC TCTTCTCCAT CCTGCTGGTC GTAGGAGGAA TCCAGATGGT TCTCTGCGCC 540
ATCCAGGTGG TCAATGGCCT CCTGGGGACC CTCTGTGGGG ACTGCCAGTG TTGTGGCTGC 600
TGTGGGGGAG ATGGACCCGT TAAA 625
```

(SEQ ID NO:1)

编码 hLRTM4 蛋白具有如下氨基酸序列：

```
MCTGCCARCL GGTLIPLAFF GFLANILLFF PGGKVIDDND HLSQEIWFFG GILGSGVLM 60
FPALVFLGLK NNDCCGCCGN EGCGKRFAMF TSTIFAVVGF LGAGYSFIIS AISINKGPKC 120
LMANSTWGYP FHDGDYLNDE ALWNKCREPL NVVPWNLTFL SILLVVGGIQ MVLCAIQVVN 180
GLLGTLCGDC QCCGCCGGDG PV 202
```

(SEQ ID NO:2)

实施例 2、hLRTM4 融合蛋白在大肠杆菌中的表达株的构建

将实施例 1 中制备的含有 hLRTM4 基因编码区的 pThLRTM4 质粒，用 EcoRI 和 XhoI 酶切，将含有 LRTM4 基因的片段克隆到 pGEX-4T-1 载体 (Amersham Pharmacia 公司) 中构建成 pGEXLR 质粒，然后转化大肠杆菌 BL21-DE3，进行扩增，筛选特异性高表达 GST-hLRTM4 融合蛋白的菌株。抽取相应菌株的质粒，通过限制性内切酶鉴定，DNA 序列测定后确证。

hLRTM4 融合蛋白的制备条件如下：经鉴定后的 pGEXLR 质粒，按照 1: 100 的比例接种到 1 升 2×YT 培养基中，37℃ 培养 3 小时后，加入 IPTG，最终浓度至 0.25mmol/L，诱导 3 小时后，离心 4000rpm，10 分钟收集菌体，菌体用 PBS 洗涤一次后，用含有 1mmol/L PMSF 的 25 毫升 PBS 悬浮菌体，超声波破碎菌体后，在溶液中加入 1% Triton X-100，混匀后离心 10000rpm，10 分钟，取上清过谷胱甘肽琼脂糖凝胶柱，过柱前先将柱子用含有 1% Triton X-100，100 mmol/L DTT，1 mmol/L PMSF 的 PBS 平衡，然后上样。用 10 倍柱床体积的 PBS 洗涤，再用 3 倍柱床体积的含有 5 mmol/L 的 pH 8.0，50 mmol/L Tris.Cl 洗脱液洗脱，收集后洗脱液，然后冰冻抽干。

结果，获得了纯化的 GST-hLRTM4 融合蛋白，分子量约 48kDa。

实施例 3、hLRTM4 抗体的制备

将实施例 1 中制备的含有 hLRTM4 基因编码区的 pThLRTM4 质粒为模板，PCR 扩增 hLRTM4 基因的第二个胞外区，引物序列为：

5' 引物序列为：5'-CATATGGGGAAGCGATTTGCGATGT-3' (SEQ ID NO:5)

3' 引物序列为：5'-CTCGAGGACCAGCAGGATGGAGAA-3' (SEQ ID NO:6)，

采用 NdeI 和 XhoI 双酶切 PCR 扩增产物，将 LRTM4 基因的胞外区序列 (SEQ ID NO:1 中第 265-510 位) 克隆到 pET24a (Novagen 公司) 载体中，形成 pET24a-EC2 质粒。然后转化大肠杆菌 BL21-DE3，扩增，抽取质粒并以相应的限制性内切酶鉴定，通过 DNA 测序确证。

经鉴定后的转化细胞株，按照 1: 100 的比例接种到 1L 2×YT 培养基中，37℃ 培养 3 小时后，加入 IPTG 至 0.5mmol/L，诱导 3 小时后，离心 4000rpm，10 分钟收集菌体，超声波破碎菌体后，在溶液中加入 10% Triton X-100 至 0.05%，混匀后离心 10000rpm，10 分钟。用 NTA 树脂柱进行亲和层析分离纯化蛋白。

取 200 微克纯化的融合蛋白，溶于 0.5 毫升去离子水中，加入等体积的福氏

完全佐剂并混匀,注射于体重 2.5 kg 的雄性新西兰大白兔。一周后使用相同的蛋白量以及福氏不完全佐剂进行加强注射。每周加强一次,连续两周后,耳静脉取血,ELISA 法测定抗体效价。当抗体效价达到要求后,颈动脉放血收集血液并制备抗血清,加入 NaN_3 至 0.1%,保存于 -20°C 。

实施例 4、检测 hLRTM4 基因在各种细胞系中的表达

检测材料:选取低分化胃癌细胞 N45、BGC823,肺癌细胞 A549,表皮癌细胞 A431,舌鳞癌细胞 Tca-8113,神经母细胞瘤细胞 SK-N-SH,恶性黑色素瘤细胞 A375,胃腺癌细胞 SGC,宫颈癌细胞 Hela,肝癌细胞 BEL-7404、SMMC7721,肝细胞瘤细胞 HepG2,肝细胞 L-02 等 13 种人的各组织细胞。

操作方法:采用 TRIZOL 试剂盒(GIBCOL/BRL 公司),按照说明书推荐的方法制备各细胞样品总 RNA。逆转录制备 cDNA 模板。检测用引物序列同实施例 1,为 (5'-GTCGTACCACCCAGAAATGT-3'(SEQ ID NO:3); 和 5'-TTTAAACGGGTCCATCTCCC-3'(SEQ ID NO:4))。进行 PCR 扩增,反应条件为 94°C 2 分钟预变性,循环反应为 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 90 秒,共进行 30 个循环。GAPDH 表达量的测定是使用 GAPDH 基因特异性的引物(GAPDHL: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'(SEQ ID NO:7); GAPDHR: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'(SEQ ID NO:8)),进行 PCR 扩增,反应条件为 94°C 2 分钟预变性,循环反应为 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 90 秒,共进行 25 个循环,反应产物作为内标。hLRTM4 与 GAPDH 的扩增产物同时电泳,检测 hLRTM4 在人体不同细胞系中的表达差异。

结果如图 1 所示, hLRTM4 基因在肝细胞(BEL-7404、SMMC7721、L-02、HepG2)、胃癌细胞(N45、BGC823、SGC)以及神经细胞 SK-N-SH 中表达,而在其它细胞系中不表达,说明 hLRTM4 基因的表达也具有一定的组织专一性。hLRTM4 基因在正常的肝细胞 L-02 中几乎不表达,在肝癌细胞 SMMC7721 中有少量表达,在肝癌细胞 BEL-7404、HepG2 中高表达。这一结果说明 hLRTM4 基因可以作为肿瘤检测的标志。

实施例 5、检测 hLRTM4 在肝癌组织样品中的表达

检测材料:135K 和 135L, 1055C 和 1055P, 183K 和 183L, 58C 和 58N, 152K 和 152L, 158K 和 158L, 1049C 和 1049P 共 7 对肝癌(K 或 C)和癌旁组织样品(N、

P 或 L)。采用 TRIZOL 试剂盒(GIBCOL/BRL 公司), 按照说明书推荐的方法制备各组织样品总 RNA。逆转录制备 cDNA 模板。hLRTM4 基因的扩增使用实施例 4 的引物, 进行 PCR 扩增, 反应条件为 94℃2 分钟预变性, 循环反应为 94℃30 秒, 55℃30 秒, 72℃90 秒, 共进行 30 个循环。GAPDH 表达量的测定是使用 GAPDH 基因特异性的引物同实施例 4, 电泳检测 hLRTM4 的表达差异。

结果如图 2 所示, hLRTM4 基因在 183K、58C、1049C 等肝癌组织中的表达, 明显高于相应的癌旁组织 183L、58N、1049P, 而相对应的内参 GAPDH 的表达却没有明显的差异, 说明 hLRTM4 基因在癌组织中特异性的高表达。这一结果证明 hLRTM4 基因在肝癌中的表达量升高, 可以作为肝癌的一个标志。

实施例 6、hLRTM4 反义核酸抑制肝癌细胞的生长

构建 hLRTM4 基因的正、反义质粒, 即利用 EcoRI 和 HindIII 切点, 将 hLRTM4 基因的编码区(SEQ ID NO:1 中第 16-625 位)正向克隆到 pCDNA3 载体(Invitrogen 公司)中构建 pCDNA3LR+质粒; 利用 XhoI 和 BamHI 切点, 将 LRTM4 基因的反向克隆到 pCDNA3 载体中构建 pCDNA3LR-质粒。

使用 LipofectAMINETM 试剂将 pCDNA3LR+质粒、pCDNA3LR-质粒分别导入 7404、L02 细胞株(7404 细胞表达 hLRTM4 基因, L02 细胞不表达 hLRTM4 基因), 用 G418 筛选稳定转染株, 得到抗药性细胞克隆团, 扩大培养。以转染 pCDNA3 空载体和未转染的野生型细胞作为对照。筛选得到 7404, 7404/pCDNA3, 7404/LR+, 7404/LR-细胞; 和 L02, L02/pCDNA3, L02/LR+, L02/LR-细胞两套细胞稳定株。

MTT 法测定细胞的生长速率。7404, 7404/pCDNA3, 7404/LR+, 7404/LR-转染细胞, 无血清 DMEM 培养 24h 同步化后按 5×10^3 /孔的细胞密度接种于 24 孔板。以噻唑蓝法(MTT 法)于 570nm 处测定 8 天内各组细胞的吸光值变化(6 孔复测), 绘制细胞生长曲线(图 3)。发现转染了反向 hLRTM4 基因的细胞株 7404/LR-细胞的生长速度明显减慢, 而 7404、7404/pCDNA3、7404/LR+细胞的生长速度未见明显变化。而 L02, L02/pCDNA3, L02/LR+, L02/LR-细胞的生长速度没有明显的差异。实验结果, 证明反义 hLRTM4 核酸能抑制肝癌细胞的生长。

实施例 7、hLRTM4 基因反义核酸抑制肿瘤生长的动物实验

制备裸鼠荷瘤模型, 即将培养的肝癌细胞 BEL-7404 用 PBS 洗一次, 按照 2

$\times 10^6$ 细胞/点的量注射与 5 周龄裸鼠的皮下。一周后, 开始尾静脉注射 pCDNA3LR+和 pCDNA3LR-质粒(实施例 6 构建的正、反义质粒)。50 μ g 质粒/次, 每三天加强一次。三周后, 处死裸鼠, 取瘤拍照。

结果如图 4 所示, 注射 pCDNA3LR-质粒的裸鼠的瘤明显比对照组的裸鼠缩小, 证明 hLRTM4 基因的反义质粒 pCDNA3LR-可以抑制肿瘤的生长, 可以作为潜在的抑癌药物。

实施例 8、hLRTM4 促进肝脏再生和肝脏损伤修复

本实施例用动物实验证实 hLRTM4 可应用于促进肝脏再生和肝脏损伤修复。

制备大鼠肝损伤模型, 用植物油溶解四氯化碳(CCl_4), 至四氯化碳浓度为 40%(V/V)。按照 0.5 ml/kg 及 1.0ml/kg 体重的量用四氯化碳灌喂大鼠。取 200 μ g 含有和 hLRTM4 基因编码区的 pCDNA3 重组质粒, 与 50 μ L 脂质体分别溶于 500 μ L PBS 后混合, 取灌喂 24 小时后的大鼠通过尾静脉将 hLRTM4 表达质粒注入大鼠体内。72 小时后, 处死大鼠, 取出肝组织置入液氮保存; 取血液静置后离心取血清。

检测组织和血清中的 hLRTM4 基因的表达量, 方法如同实施例 4。即采用 TRIZOL 试剂盒(GIBCOL/BRL 公司), 按照说明书推荐的方法制备组织样品总 RNA, 进行 PCR 扩增 hLRTM4 基因表达产物, 同时扩增 GAPDH 基因产物作为内标。hLRTM4 与 GAPDH 的扩增产物同时电泳, 扫描定量, 计算 hLRTM4 与 GAPDH 量的比值来确定 hLRTM4 的表达水平的高低。

检测血清中的转氨酶活力来确定组织的损伤修复度。使用转氨酶定量试剂盒(Transaminases Quantitative Kit, SIGMA 公司), 按照产品说明推荐方法检测血清中 GPT 水平: 取 100 微升丙氨酸- α -KG 底物 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热后, 加入 20 微升血清, 混合后 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 分钟, 然后加入 100 微升显色试剂, 混合后放置室温 20 分钟, 加入 1 毫升 0.4 mol/L NaOH, 混匀后放置至少 5 分钟后, 以水作为对照, 测定 505 nm 光吸收。按照说明绘制标准曲线, 在标准曲线得到每个样品中的 GPT 含量。

结果如图 5 所示, 采用 CCl_4 肝损伤动物模型, 1 为正常大鼠, 2 为灌喂 0.5 毫升四氯化碳/千克体重, 3 为灌喂 1 毫升四氯化碳/千克体重, 其中 2、3 组的黑色柱型表示导入 hLRTM4 基因。结果表明, 正常肝组织中 GPT 水平较低; 摄入四氯化碳后, GPT 水平升高, 并且摄入量越大, GPT 水平越高; 导入 hLRTM4 基因后, 伴随 GPT 水平下降。这表明 hLRTM4 基因对肝组织损伤有修复作用。

综上所述, hLRTM4 蛋白为一新发现的人肝再生相关蛋白。

实施例 9、以 hLRTM4 基因为靶标设计的干扰性小分子 dsRNA 抑制肝癌细胞的生长

在本实施例中，根据 LRTM4 基因序列，设计并合成以下双链 RNA 片段，导入 BEL-7404 肝癌细胞(购自中国科学院)，导致与其同源的 LRTM4 的 mRNA 降解，从而抑制 BEL-7404 肝癌细胞的生长。小分子 dsRNA 的序列如下(只标明正义链)：

	序列	SEQ ID NO:
dsRNA1*	5'-ggaagcggugucuugaugauc-3'	9
dsRNA2*	5'-gggaagcgauuugcgauguuc-3'	10
dsRNA3*	5'-ggaacaagugccgagagccuc-3'	11
dsRNA4*	5'-gggugcugcggcaacgagggc-3'	12
dsRNA5*	5'-guuuaaaccuccgagaugagc-3'	13

*:3' 端带有 dtdt。

实验操作如下：分别取 50ng 合成的双链 RNA，加入 LipofectAMINE 转染试剂 (Life Technologies, GibcoBRL) 混合后，分别将这些双链 RNA 转染 BEL-7404 细胞，获得 BEL-7404/LRTM4-RNAi 细胞。转染 72 小时后，分别取 BEL-7404 和 BEL-7404/LRTM4-RNAi 细胞，无血清 DMEM 培养 24 小时后，按 5×10^3 /孔的细胞密度接种于 24 孔板。以噻唑蓝法 (MTT 法) 于 570nm 处测定 8 天内各组细胞的吸光值变化 (6 孔复测)，绘制细胞生长曲线。

结果：分别转染了 SEQ ID NO:9-13 的干扰性 dsRNA 的 7404 细胞株的生长速度明显变慢。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1. 一种药物组合物，其特征在于，它含有安全有效量人肝再生相关蛋白，以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

2. 如权利要求 1 所述的组合物，其特征在于，所述的人肝再生相关蛋白具有 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。

3. 如权利要求 1 所述的组合物，其特征在于，所述的安全有效量的人肝再生相关蛋白为 1 微克/千克体重/每天-5 毫克/千克体重/每天。

4. 一种人肝再生相关蛋白的用途，其特征在于，用于制备治疗肝脏损伤的药物。

5. 如权利要求 4 所述的用途，其特征在于，所述的药物用于治疗急慢性肝炎、肝硬化或肝癌引起的肝脏病变。

6. 一种药物组合物，其特征在于，它含有安全有效量人肝再生相关蛋白的拮抗剂，所述的拮抗剂选自 (i) hLRTM4 的反义核酸分子，所述的核酸分子具有 SEQ ID NO:1 中所示的长度为 15-625bp 的核酸序列，(ii) hLRTM4 的干扰性小分子双链 RNA，所述的 RNA 具有 SEQ ID NO:1 中所示的长度为 17-23bp 的核酸序列并且在 3' 端具有 dtdt；和/或 (iii) hLRTM4 的特异性抗体，

以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

7. 如权利要求 6 所述的组合物，其特征在于，所述的核酸分子具有全长的 SEQ ID NO:1 反义序列。

8. 如权利要求 6 所述的组合物，其特征在于，所述的安全有效量的人肝再生相关蛋白的拮抗剂为 1 微克/千克体重/每天-5 毫克/千克体重/每天。

9. 一种人肝再生相关蛋白拮抗剂的用途，所述的拮抗剂选自 (i) hLRTM4 的反义核酸分子，所述的核酸分子具有 SEQ ID NO:1 中所示的长度为 15-625bp 的核酸序列，和/或 (ii) hLRTM4 的特异性抗体，其特征在于，所述的拮抗剂用于制备抑制肝癌的药物。

10. 如权利要求 9 所述的用途，其特征在于，所述的拮抗剂是 hLRTM4 的反义核酸分子，所述的核酸分子具有 SEQ ID NO:1 中所示的长度为 15-625bp 的核酸序列。

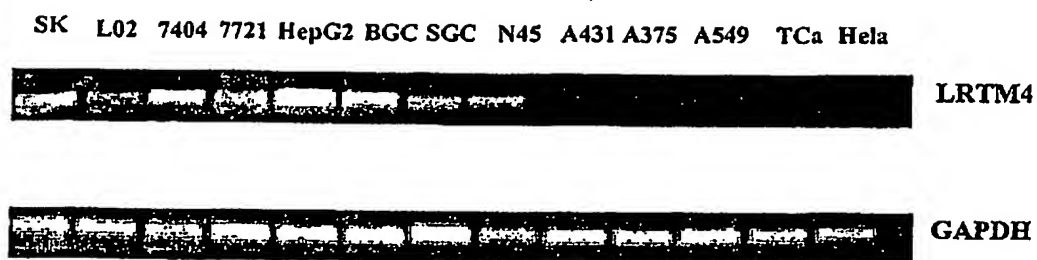


图 1

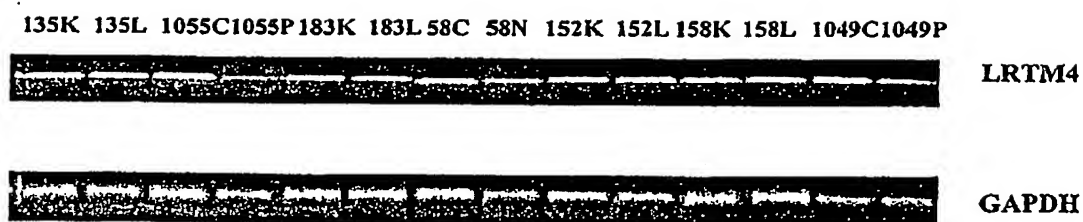


图 2

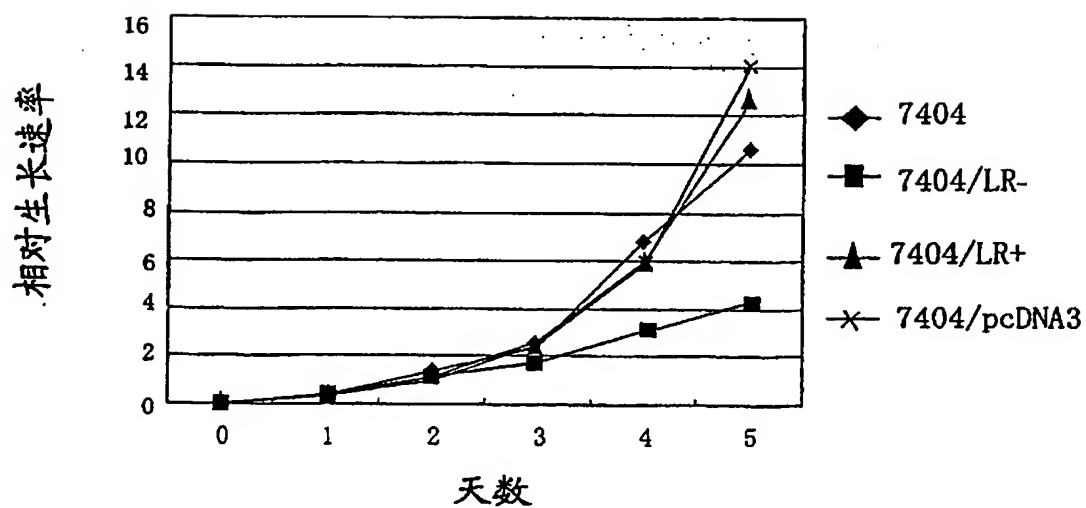


图 3

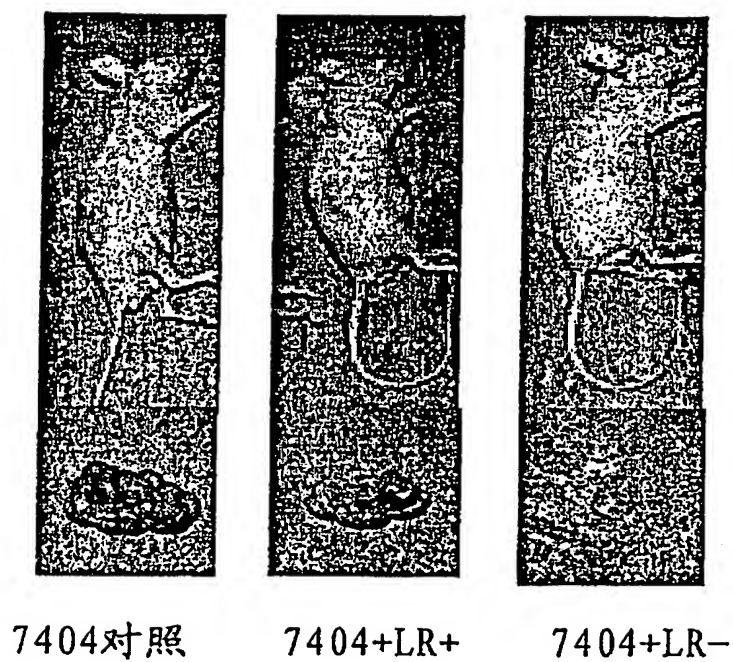


图 4

CCl ₄	-	+	+	+	+
hLRTM4	-	-	+	-	+

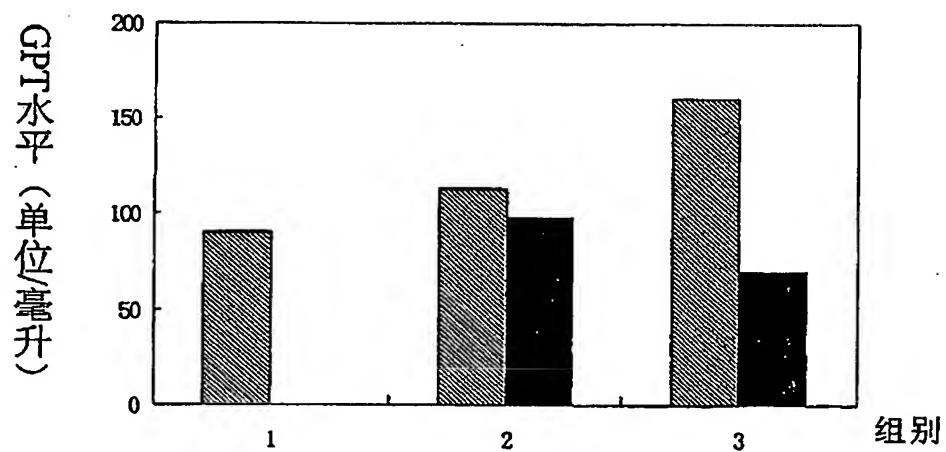


图 5

序列表

<110> 中国科学院上海生命科学研究院

<120> 人肝再生相关蛋白及其用途

<130> 027884 PCWO

<150> CN 03114718.6

<151> 2003-01-03

<160> 13

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 625

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (16)..(621)

<223>

<400> 1

```

tcgtaccacc ccaga atg tgc act gga ggc tgt gcc aga tgc ctg ggg ggg      51
      Met Cys Thr Gly Gly Cys Ala Arg Cys Leu Gly Gly
              1              5              10
acc ctc att ccc ctt gct ttt ttt ggc ttc ctg gct aac atc ctg tta      99
Thr Leu Ile Pro Leu Ala Phe Phe Gly Phe Leu Ala Asn Ile Leu Leu
      15              20              25
ttt ttt cct gga gga aaa gtg ata gat gac aac gac cac ctt tcc caa      147
Phe Phe Pro Gly Gly Lys Val Ile Asp Asp Asn Asp His Leu Ser Gln
      30              35              40
gag atc tgg ttt ttc gga gga ata tta gga agc ggt gtc ttg atg atc      195
Glu Ile Trp Phe Phe Gly Gly Ile Leu Gly Ser Gly Val Leu Met Ile
      45              50              55              60
ttc cct gcg ctg gtg ttc ttg ggc ctg aag aac aat gac tgc tgt ggg      243
Phe Pro Ala Leu Val Phe Leu Gly Leu Lys Asn Asn Asp Cys Cys Gly
      65              70              75
tgc tgc ggc aac gag ggc tgt ggg aag cga ttt gcg atg ttc acc tcc      291
Cys Cys Gly Asn Glu Gly Cys Gly Lys Arg Phe Ala Met Phe Thr Ser
      80              85              90
acg ata ttt gct gtg gtt gga ttc ttg gga gct gga tac tcg ttt atc      339
Thr Ile Phe Ala Val Val Gly Phe Leu Gly Ala Gly Tyr Ser Phe Ile
      95              100              105
atc tca gcc att tca atc aac aag ggt cct aaa tgc ctc atg gcc aat      387
Ile Ser Ala Ile Ser Ile Asn Lys Gly Pro Lys Cys Leu Met Ala Asn
      110              115              120
agt aca tgg ggc tac ccc ttc cac gac ggg gat tat ctc aat gat gag      435
Ser Thr Trp Gly Tyr Pro Phe His Asp Gly Asp Tyr Leu Asn Asp Glu
      125              130              135              140
gcc tta tgg aac aag tgc cga gag cct ctc aat gtg gtt ccc tgg aat      483
Ala Leu Trp Asn Lys Cys Arg Glu Pro Leu Asn Val Val Pro Trp Asn
      145              150              155
ctg acc ctc ttc tcc atc ctg ctg gtc gta gga gga atc cag atg gtt      531
Leu Thr Leu Phe Ser Ile Leu Leu Val Val Gly Gly Ile Gln Met Val
      160              165              170
ctc tgc gcc atc cag gtg gtc aat ggc ctc ctg ggg acc ctc tgt ggg      579
Leu Cys Ala Ile Gln Val Val Asn Gly Leu Leu Gly Thr Leu Cys Gly

```

175 180 185
 gac tgc cag tgt tgt ggc tgc tgt ggg gga gat gga ccc gtt taaa 625
 Asp Cys Gln Cys Cys Gly Cys Cys Gly Gly Asp Gly Pro Val
 190 195 200

<210> 2
 <211> 202
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

Met Cys Thr Gly Gly Cys Ala Arg Cys Leu Gly Gly Thr Leu Ile Pro
 1 5 10 15
 Leu Ala Phe Phe Gly Phe Leu Ala Asn Ile Leu Leu Phe Phe Pro Gly
 20 25 30
 Gly Lys Val Ile Asp Asp Asn Asp His Leu Ser Gln Glu Ile Trp Phe
 35 40 45
 Phe Gly Gly Ile Leu Gly Ser Gly Val Leu Met Ile Phe Pro Ala Leu
 50 55 60
 Val Phe Leu Gly Leu Lys Asn Asn Asp Cys Cys Gly Cys Cys Gly Asn
 65 70 75 80
 Glu Gly Cys Gly Lys Arg Phe Ala Met Phe Thr Ser Thr Ile Phe Ala
 85 90 95
 Val Val Gly Phe Leu Gly Ala Gly Tyr Ser Phe Ile Ile Ser Ala Ile
 100 105 110
 Ser Ile Asn Lys Gly Pro Lys Cys Leu Met Ala Asn Ser Thr Trp Gly
 115 120 125
 Tyr Pro Phe His Asp Gly Asp Tyr Leu Asn Asp Glu Ala Leu Trp Asn
 130 135 140
 Lys Cys Arg Glu Pro Leu Asn Val Val Pro Trp Asn Leu Thr Leu Phe
 145 150 155 160
 Ser Ile Leu Leu Val Val Gly Gly Ile Gln Met Val Leu Cys Ala Ile
 165 170 175
 Gln Val Val Asn Gly Leu Leu Gly Thr Leu Cys Gly Asp Cys Gln Cys
 180 185 190
 Cys Gly Cys Cys Gly Gly Asp Gly Pro Val
 195 200

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> 引物

<400> 3
 gtcgtaccac cccagaatgt

20

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> 引物

<400> 4
tttaaacggg tccatctccc 20

<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(25)
<223> 引物

<400> 5
catatgggga agcgatttgc gatgt 25

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(24)
<223> 引物

<400> 6
ctcgaggacc agcaggatgg agaa 24

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> 引物

<400> 7
accacagtcc atgccatcac 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> 引物

<400> 8
tccaccaccc tgttgctgta 20

<210> 9
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> 双链小分子 RNA

<400> 9
ggaagcggug ucuugaugau c 21

<210> 10
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> 双链小分子 RNA

<400> 10
gggaagcgau uu gcgauguu c 21

<210> 11
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> 双链小分子 RNA

<400> 11
ggaacaagug ccgagagccu c 21

<210> 12
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> 双链小分子 RNA

<400> 12
gggugcugcg gcaacgaggg c 21

<210> 13
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> 双链小分子 RNA

<400> 13
guuuuaaccu ccgagaugag c 21

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☒ SKEWED/SLANTED IMAGES

☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.